

NO/EP

oversettelse vedrørende EP patentsøknad/EP Patent

patent varemærke design
Patentstyret 

Sandakerveien 64
Pb. 8160 dep 0033 Oslo
Telefon +47 22 38 73 00
Infosenter +47 22 38 73 33
mail@patentstyret.no
www.patentstyret.no
Bankgiro 8276 01 00192
Org.nr. 971526157 MVA

Fyll inn et eller begge numrene:

EP publiseringsnummer: EP2376642

EP søknadsnummer: 09774846.1

Flere søkere/innehavere på neste side

Søker/innehaver

Fornavn/foretaksnavn: Borregaard AS		Etternavn:
Adresse: Hjalmar Wessels vei 10		
Postnummer: N-1721	Poststed: Sarpsborg	Land: Norge
Organisasjonsnummer, hvis foretak:		Ev. kundennummer i Patentstyret:

**Fullmektig /
Korrespondanse
adresse**

Fornavn/foretaksnavn: ONSAGERS AS		Etternavn:
Adresse:		
Postnummer:	Poststed:	Land:
Organisasjonsnummer, hvis foretak:		Ev. kundennummer i Patentstyret: 1075

**Norsk
benevnelse/
tittel**

KONVERTERING AV LIGNOCELLULOSISK BIOMASSE

Bilag

- Norsk oversettelse av krav (A1)
- Norsk oversettelse av krav u/granskningsrapport (A2)
- Norsk oversettelse av patent (B1)
- Norsk oversettelse av patent (B2)
- Norsk oversettelse av patent (B3)
- Sekvensliste
- Tegning(er)
- Fullmakt

Signatur

Navn/foretaksnavn (i blokkbokstaver): ONSAGERS AS	Ev. referanse: P23615NOEP
--	------------------------------

Sted: OSLO	Dato: 21. FEBRUAR 2014	Signatur: <i>Lise Frøehjem</i>
---------------	---------------------------	-----------------------------------

Den foreliggende oppfinnelsen angår en fremgangsmåte for produksjon av annen-
 generasjons biodrivstoff og/eller sukkerbaserte kjemikalier - for eksempel etanol, butanol
 osv. - og/eller materialer - for eksempel plaststoffer, enkeltcelleproteiner osv. - sammen
 med sulfonert lignin (lignosulfonat) fra lignocellulosisk biomasse, spesielt fra
 5 lignocellulosisk biomasse omfattende, blant annet, energivekster, årlige planter,
 jordbruksavfall eller trevirke.

Spesielt angår den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for produksjon av
 monosakkarider, sukkerbaserte kjemikalier, biodrivstoff eller materialer sammen med
 sulfonert lignin fra lignocellulosisk biomasse omfattende i det minste de følgende trinn:

- 10 (i) forbehandling av en lignocellulosisk biomasse i et sulfittkoketrinn;
- (ii) separasjon av den forbehandlede lignocellulosiske biomassen fra trinn (i) til
- (a) en flytende «brukt sulfittvæske»-fase omfattende 60 % eller mer av ligninet til
 den lignocellulosiske biomassen i form av sulfonert lignin, og til
- 15 (b) en masse omfattende 70 % eller mer av cellulosen til den lignocellulosiske
 biomassen;
- (iii) hydrolyse av massen (b) fra trinn (ii) til en sukkerkjemi-plattform omfattende
 monosakkarider;
- (iv) eventuelt ytterligere prosessering av monosakkaridene fra trinn (iii) som gir nyttige
 kjemikalier, biodrivstoff og/eller proteiner; og
- 20 (v) direkte konvertering eller ytterligere prosessering av det sulfonerte ligninet i den
 flytende fasen (a) fra trinn (ii) til nyttige kjemikalier og/eller materialer,
 hvor hydrolysetrinn (iii) er et enzymatisk hydrolysetrinn.

Bakgrunn og Tidligere kjent teknikk

25 Som generelt akseptert er ressursene for petroleum-baserte kjemikalier, og for petroleum
 brukt som (fossilt) drivstoff, begrensede. En for tiden anvendt alternativ ressurs er
 "biodrivstoff" oppnådd fra biomasse. Forskjellige biomassekilder kan bli brukt.

"Førstegenerasjons biodrivstoff" er biodrivstoff lagd fra sukker, stivelse, vegetabilsk olje,
 eller animalsk fett ved bruk av konvensjonell teknologi. Eksempelvis grunnleggende
 råstoff for produksjon av førstegenerasjons biodrivstoff er frø eller korn sånn som hvete,
 30 som gir stivelse som blir hydrolysert og fermentert til bioetanol, eller solsikkefrø, som
 blir presset for å gi vegetabilsk olje som kan bli omdannet til biodiesel. Imidlertid kunne
 disse råstoffene i stedet gått inn i den animalske eller menneskelige næringskjeden.
 Førstegenerasjons biodrivstoff har derfor blitt kritisert for å lede mat bort fra den
 menneskelige næringskjeden, for slik å lede til matmangler og prisøkninger.

35 I kontrast til dette kan "annen-generasjons biodrivstoff" bli produsert bærekraftig ved å
 bruke biomasse bestående av de resterende ikke-mat (dvs. ufordøyelige) delene av
 nåværende avlinger, sånn som stilker, blader, bagasse (fiberrester av sukkerrør fiber),

skall osv. som er igjen når matavlingen har blitt ekstrahert, så vel som andre råstoff som ikke blir brukt for matformål (ikke-matavlinger), sånn som trevirke, årlige planter og korntyper som omfatter lite korn, og også industriavfall sånn som sagflis, skall og masse fra fruktpressing, vinprosessering osv.

- 5 Et vanlig problem ved produksjon av annen-generasjons biodrivstoff fra biomasse er ekstraksjonen av fermenterbart råstoff fra den "treaktige" eller fibrøse biomassen. Spesielt er karbohydratene som kan bli hydrolysert og fermentert (spesielt cellulose og, hvis til stedet, hemicellulose) sammenflettet med lignin (følgelig, i det følgende vil slik biomasse bli referert til som "lignocellulosisk biomasse").
- 10 Lignin er en kompleks heterogen polymer som ikke kan bli underlagt hydrolyse-/fermenteringssyklusen brukt på cellulosen/hemicellulosen. Lignin slik den vanligvis blir produsert er ikke en spesielt nyttig substans og blir typisk kastet eller brent (og gir en viss fordel som prosessvarme) etter separasjon. I et fremtidig effektivt bioraffineri, må ikke bare alle hovedkomponenter av lignocellulose bli separert, men alle må også bli utnyttet.
- 15 Karbohydratene kan bli brukt som en plattform for sukkerbaserte kjemikalier, f.eks. etanol.

Forbehandling (før hydrolyse) av det lignocellulosiske materialet blir vanligvis oppnådd ved hjelp av dampvarming, dampekspløsjon eller enzymatisk forbehandling, blant annet.

- 20 En kontinuerlig prosess for å behandle et lignocellulosisk råstoff er gitt i WO 2006/128304. Denne fremgangsmåten omfatter å forbehandle det lignocellulosisk råstoffet under trykk i en forbehandlingsreaktor ved en pH mellom omtrent 0.4 og omtrent 2.0. En mindre del av ligninet vil bli oppløst under sure betingelser som dette, men hoveddelen av biomasseligninfraksjonen fra denne prosessen vil ikke være oppløselig i vann, og vil bli separert sammen med andre uløselige stoffer.
- 25 En annen fremgangsmåte for å konvertere lignocellulosisk materiale er beskrevet i US 6423 145. En modifisert fremgangsmåte med fortynnet syre for å hydrolysere cellulosen og hemicellulosen i lignocellulosisk materiale under betingelser for å få høyere totalutbytter av fermenterbart sukker enn de man kan få ved bruk av fortynnet syre alene, omfattende: å impregnere et lignocellulosisk råstoff med en blanding av en mengde
- 30 vandig løsning av en fortynnet syrekatalysator og en metallsaltkatalysator tilstrekkelig til å gi høyere totalutbytter av fermenterbart sukker enn de man kan få når man hydrolyserer med fortynnet syre alene; å laste det impregnerte lignocellulosiske råstoffet inn i en reaktor og å varme i en tilstrekkelig tidsperiode for å hydrolysere hovedsakelig all hemicellulosen og mer enn 45 % av cellulosen til vannløselige sukker; og å gjenvinne
- 35 de vannløselige sukkerne. Denne prosessen produserer uløselige ligniner som kan bli separert sammen med ikke-hydrolysert biomasse og andre uløselige stoffer.

- 40 En nyere fremgangsmåte for forbehandling er beskrevet i US 2008/0190013. US '013 viser en fremgangsmåte for å konvertere lignocellulosisk material til biodrivstoff. I spesifikke utførelsesformer omfatter fremgangsmåten å forbehandle lignocellulosisk materiale ved å oppløse materialet i ioniske væsker. Det forbehandlede lignocellulosiske materialet kan bli isolert, sånn som ved utfelling med et regenererende løsemiddel (f.eks., vann), og bli brukt direkte i dannelsen av biodrivstoff, inkludert å undergå hydrolyse for å danne sukker og fermentering for å danne drivstoff, sånn som bioetanol. Den ioniske væsken kan bli resirkulert for videre bruk, sånn som ved fordamping av vannet

introdusert i løpet av utfelling, og resirkuleringen gir en vei til en hemicelluloserik fraksjon og en ionisk væske av konsistent kvalitet og trevirkeoppløsningsegenskaper. Den gjenvunnede hemicellulosen har betydelig utnyttelsespotensial i forhold til råvare og spesielle anvendelser. Denne prosessen produserer også ligniner som er uløselige i vann.

- 5 Svensk Patent nr. 527 646 foreslår en fremgangsmåte for produksjon av drivstoff for motorer og brenselceller fra lignocellulosisk material. Ligninet blir oppløst fra det lignocellulosiske materialet ved en koking, fortrinnsvis ved en soda-koking. Kokevæsken blir gassifisert for å produsere syngass og deretter metanol, DME osv., mens cellulosen og hemicellulosen i massen blir hydrolysert ved syre (svak eller sterk) eller enzymer og
10 deretter fermentert til etanol.

- En artikkel av J.Y. Zhu et al. ("Sulfitt Pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine"; *Bioresource Technology* 100 (2009) 2411-2418) publisert på internett, desember 31, 2008 rapporterer sulfitt-forbehandling for å
15 overvinne gjenstridigheten til lignocellulose ovenfor effektiv biokonvertering av myke trevirker. SPORL-prosessen hadde også blitt presentert av Zhu ved AIChE 2008 årlige møte i Philadelphia, USA, i november 2008, se poster 573n.

For å komme frem til en prosess hvor konverteringen av annen-generasjons biomasse til biodrivstoff blir utført på en økonomisk og bærekraftig måte, må en rekke utfordringer håndteres.

- 20 Ligninkomponenten blir vanligvis brent, imidlertid er det ønskelig å kunne konvertere ligninet til verdifulle kjemikalier med kommersiell verdi. Imidlertid er ligniner fra mange av prosessene urene og er dårlig løselige i vann, noe som gjør dem vanskelige å prosessere videre til verdifulle kjemikalier.

- Ligninene i biomasse er kjent for å adsorbere cellulolytiske enzymer og derved ha en
25 inhiberende effekt på enzymene anvendt til å hydrolysere cellulose til cellobiose og glukose. Dette øker mengden av enzymer som behøves betydelig. I tillegg er kompleksiteten til enzymblandingen som behøves betydelig siden cellulosefibre fortsatt er innebygd i både lignin og hemicellulose. Kostnaden av enzymer er derfor en stor utfordring i biomasse til biodrivstoff prosesser i tillegg til lavt totalt utbytte av
30 produkter. Uheldigvis etterlater alle kjente forbehandlingsprosesser ligniner som inhiberer disse enzymene, selv når de er redusert til lave nivåer (under 5 %).

Resirkulering av enzymer er også vanskelig siden enzymene er ikke-spesifikt bundet til ligninet i hydrolyse-prosesstrinnet.

- 35 En annen utfordring for annen-generasjons bioetanolproduksjon, fra et kommersielt synspunkt, er det lave totalutbyttet av verdifulle kjemikalier og spesielt å tilveiebringe verdifulle kjemikalier med en høyere verdi enn energiverdien til xylan og lignin.

- I lys av tidligere kjent teknikk blir det søkt etter en fremgangsmåte for å konvertere lignocellulosisk biomasse som på en bedre måte forbereder cellulosen for hydrolyse så vel som å muliggjøre en mer komplett anvendelse av biomassen ved å tilveiebringe et
40 høyere utbytte av ytelseskjemikalier og/eller biodrivstoff.

Disse formålene og andre blir løst ved en fremgangsmåte for produksjon av monosakkarider, sukkerbaserte kjemikalier eller biodrivstoff eller materialer sammen med sulfonert lignin fra lignocellulosisk biomasse omfattende i det minste de følgende trinn:

- 5 (i) forbehandling av en lignocellulosisk biomasse i et sulfittkokingstrinn;
- (ii) separasjon av den forbehandlede lignocellulosiske biomassen fra trinn (i) til
- (a) en flytende «brukt sulfittvæske»-fase omfattende 60 % eller mer av ligninet til den lignocellulosiske biomassen i form av sulfonert lignin, og til
- 10 (b) en masse omfattende 70 % eller mer av cellulosen til den lignocellulosiske biomassen;
- (iii) hydrolyse av massen (b) fra trinn (ii) til en sukkerkjemi-plattform omfattende monosakkarider;
- (iv) eventuelt ytterligere prosessering av monosakkaridene fra trinn (iii) som gir nyttige kjemikalier, biodrivstoff og/eller proteiner; og

- 15 (v) direkte konvertering eller ytterligere prosessering av det sulfonerte ligninet i den flytende fasen (a) fra trinn (ii) til nyttige kjemikalier og/eller materialer,
- hvor hydrolysetrinnet (iii) er et enzymatisk hydrolysetrinn.

I en foretrukket utførelsesform og basert på typen av rå lignocellulosisk biomasse, kan et mekanisk behandlingstrinn (0) bli utført før trinn (i). I nevnte mekaniske behandlingstrinn blir biomassen delt opp i mindre biter eller partikler ved mekanisk behandling. Dette trinnet er unødvendig, for eksempel, i tilfellet av bruk av bagasse som et råmateriale.

I forbehandlingstrinnet (i) blir den lignocellulosiske biomassen kokt med en sulfitt, fortrinnsvis en natrium, kalsium, ammonium eller magnesium sulfitt under sure, nøytrale eller basiske betingelser. Dette forbehandlingstrinnet løser opp mesteparten av ligninet som lignosulfonat sammen med deler av hemicellulosen. Denne oppløste eller flytende fasen (massedanningsvæske; også kjent som brukt sulfittvæske (eng. "Spent Sulfitt Liquor", "SSL")) er den flytende SSL-fasen (a) i trinn (ii). Cellulosen blir etterlatt nesten intakt i massen (b) sammen med deler av hemicellulosen.

30 Ved å behandle den lignocellulosiske biomassen i henhold til prosessen beskrevet over, blir det skapt en spesielt effektiv bioraffineri-plattform.

Ved spesifikt å anvende en sulfittkoking som forbehandlingstrinnet i den totale prosessen, blir det oppnådd en god separasjon av karbohydratene cellulose og hemicellulose fra ligninet. Den resulterende massen er spesielt let å hydrolysere grunnet modifiseringen i løpet av kokingen, noe som leder til redusert kostnad for sakkarifisering.

Innholdet av det gjenværende, uoppløste ligninet i massen som blir igjen etter den oppfinneriske behandlingen er funnet å ikke være av særlig betydning for hvor lett

cellulosen kan bli hydrolysert av enzymer. Dette er meget overraskende og forskjellig fra det som har blitt rapportert tidligere, se Mooney CA. et al., 1998, "The effect of the initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwood", *Biores. Technol.* 64, 2, 113-119 og Lu Y. et al., 2002, "Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues", *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98-100, 641-654.

Uten å ønske å være bundet av teori kan man anta at sulfitt-forbehandlingen endrer ligninet på en måte som reduserer eller fjerner dets inhiberende effekt og dermed gjør det mulig med høye hydrolyseutbytter ved et lavt enzymforbruk.

10 Denne ikke-inhiberende egenskapen til det gjenværende ligninet gjør det også lettere å resirkulere enzymene ved f.eks. substratadsorpsjon eller membranfiltrering og gjør anvendelsen av lengelevende enzymer mer interessant og den totale prosessen mer økonomisk.

15 Videre blir det oppnådd et mye høyere utbytte av salgbare produkter sammenlignet med andre prosesser, hovedsakelig grunnet isoleringen og utnyttelsen av et salgbart ligninprodukt, nemlig lignosulfonat.

20 Ved å utføre prosessen ifølge oppfinnelsen kan mer enn 80 vekt% av det lignocellulosiske biomasseråstoffet bli omdannet til salgbare produkter og utbytter på opptil 90 % av den teoretiske mengden med fermenterbare sukkerer oppnåelige. En utførelsesform av den integrerte totale prosessen er vist som eksempel i Figur 1 og er beskrevet i mer detalj under.

Følgelig, hovedfordelene med den foreliggende prosessen omfatter:

- 25 • Lignin blir konvertert fra en uløselig form til en vannløselig form som forenkler lett separasjon av vannløselige ligniner med overraskende overlegne egenskaper som ytelseskjemikalier (eng. performance chemicals) og i produksjon av rene lignin kjemikalier.
- 30 • Videre blir cellulosen i massen lett degradert av enzymer som forklart over og bringer enzymforbruket og -kostnader til et akseptabelt nivå. Dette blir trodd å være på grunn av det faktum at i løpet av sulfittkokingstrinnet blir cellulosefibrene separert og ikke lenger innebygd i lignin og hemicelluloser. Ligninet som er igjen i den cellulose-inneholdende massen etter sulfittforbehandlingen er mindre inhibitorisk for enzymene enn naturlig lignin i nedstrømsprosesseringsstrinnet for enzymatisk hydrolyse. Denne effekten var helt uventet.
- 35 • Siden enzymer tydeligvis ikke blir adsorbent irreversibelt til ligninet som er igjen i cellulosemassen eksponert for hydrolysetrinnet, kan enzymene også bli resirkulert. Dette reduserer enzymforbruket, og dermed prosesskostnadene, ytterligere.

40 Kort Beskrivelse av Figurene

- Figur 1 er et flytskjema av et foretrukket bioraffinerikonsept ifølge den foreliggende oppfinnelsen.
- Figur 2 er et flytskjema av en foretrukket utførelsesform som i tillegg bruker oksygen- og/eller alkalidelignifisering.
- 5 Figur 3 viser resultater for enzymatisk hydrolyse av soda-kokene I og II til sammenligningseksempel I [korrelasjon mellom Kappa-tall (gjenværende lignin) og glukoseutbytte (fordøyelighet)].
- Figur 4 viser sammenligningen av sulfittbehandlings- og sodakokmasser i løpet av enzymatisk hydrolyse med Celluclast.

10

Detaljert beskrivelse av den foreliggende oppfinnelsen

Råmaterialer

- Med hensyn til råmaterialet for den lignocellulosiske biomassen, eksisterer det ikke noen prinsipielle begrensninger, bortsett fra at biomassen må omfatte cellulose og lignin.
- 15 Foretrukne råmaterialer som er egnet for det foreliggende bioraffinerikonseptet er energivekster, årlige planter, jordbruksrester og trevirke.

Kommersielle energivekster er typisk tett plantede, avlingstyper med høyt utbytte som fortrinnsvis er av ingen eller begrenset verdi som matvarer. For eksempel er tre-avlinger sånn som Salix, Miscanthus, Piletre eller Poppel foretrukne energivekster.

- 20 Foretrukne eksempler på årlige planter er strå, sukkerrør og kassava. De gror alle raskt og har generelt en relativt lav mengde med lignin (sammenlignet med trevirke).

Jordbruksrester inkluderer de deler av dyrkbare avlinger som ikke skal brukes til det primære formål å produsere mat, for eller fibere, for eksempel brukt dyrestrø og fjær. Disse restene er eksemplifisert ved bagasse fra sukkerrør og maisstilker.

- 25 Det spesielt foretrukne startmaterialet sukkerrør kan bli delt i bagasse, sukker og strå. Bagasse er et fibrøst materiale bestående av cellulose, hemicellulose, lignin, ekstrakter, uorganiske salter og andre organiske substanser sånn som proteiner og organiske syrer.

- 30 Bagasse og hardtrevirke har mange likheter, dvs. høyt innhold av xylan, kortere fiberlengde og lavere lignin- og celluloseinnhold sammenlignet med mykt trevirke. Imidlertid har bagasse et litt høyere askeinnhold. Askeinnholdet kan forklares med forskjeller i plantemorfologi og innhøstingsmetode. Den korte fiberlengden i bagasse er hovedsakelig grunnet dens høye innhold av marg (eng. pith) (-30 %).

- 35 Totalt, basert på det faktum at det ikke er behov for noen mekanisk størrelsesreduksjon og at høyere hydrolyseutbytter blir oppnådd, er det spesielt foretrukket å utføre prosessen ifølge den foreliggende oppfinnelsen med jordbruksrester som ikke er trevirke, spesielt bagasse, som råmaterialer.

Trevirke er også et materiale for det foreliggende bioraffinerikonseptet. Deri er alle typer av trevirke egnet.

5 Den lignocellulosiske biomassen blir (for)behandlet før hydrolyse og ytterligere prosessering av monosakkaridene og andre komponenter. En (for)behandling kan være mekanisk eller kjemisk.

I mekanisk (for)behandling blir moment eller energi overført til råmaterialet, for eksempel ved hjelp av å dele eller å kutte eller å slå biomasse til mindre partikler. Ingen kjemiske reagenser blir tilsatt deri og den kjemiske strukturen til komponentene til råmaterialet forblir hovedsakelig upåvirket.

10 I kjemisk (for)behandling blir i det minste ett kjemisk reagens tilsatt og den kjemiske strukturen av i det minste en komponent av råmaterialet blir endret. Som diskutert i mer detalj under er "sulfitt-massedannelse" en kjemisk forbehandling.

Mekanisk behandling

15 Basert på typen av rå lignocellulosisk biomasse kan et mekanisk behandlingstrinn (0) bli utført før trinn (i). I nevnte mekaniske behandlingstrinn blir biomassen delt opp i mindre biter eller partikler ved mekanisk behandling. Dette trinnet er unødvendig, for eksempel, i tilfellet når bagasse eller sagflis bli brukt som et råmateriale.

20 Derfor, i en foretrukket utførelsesform blir et råmateriale brukt i konverteringen av lignocellulosisk biomasse som ikke krever mekanisk (for)behandling og hvor sulfittkoking er den eneste (for)behandlingen.

Forbehandling: Sulfittmassedannelse

25 Massedannelse (eng. «pulping») (eller koking) av trevirke med sulfitt var en av de første kjemiske fremgangsmåtene anvendt i massedannelse av trevirks, så tidlig som på 1860-tallet.

30 Den første (tre)massemøllen (eng. masse mill) som brukte sulfittprosessen ble bygd i Sverige i 1874 og brukte magnesium som mot-ion. Kalsium var standard mot-ion helt til 1950-tallet. Sulfittmassedannelse var den dominerende prosessen for å lage trevirke-masse til den ble overgått av den såkalte "Kraft"-prosessen på 1940-tallet. Domineringen til Kraft-massedannelse (eng. pulping) er basert på det faktum at sulfittprosessen blir typisk utført under betingelser som hydrolyserer noe av cellulosen, noe som betyr at sulfittmassefibere ikke er like sterke som Kraft-massefibere, noe som er en spesiell ulempe med sulfittmassedannelse for hovedsakelig bruk i papirmassedannelse.

35 Sulfittmasser står nå for mindre enn 10 % av den totale kjemiske masseproduksjonen. Disse gjenværende sulfittmassene blir brukt i spesialpapir og (for eksempel i form av såkalt oppløsende masse (eng. "dissolving masse")) for å lage cellulose-derivater.

Ulikt den natrium-baserte Kraft-prosessen som blir utført ved en pH av den ferske kokevæsken på omtrent 13, er sulfittprosessen karakterisert ved at den dekker hele pH-området. pH'en kan variere fra < 1 (ved bruk av svoveldioksid løsninger i vann) til > 13 (ved bruk av svoveldioksid eller natriumsulfitt eller natriumbisulfitt sammen med natriumhydroksid).

5

Sulfittkoking kan bli delt opp i fire hovedgrupper: sur, sur bisulfitt, svakt alkalisk og alkalisk sulfittmassedannelse.

En annen spesiell fordel med sulfittforbehandling angår ligninet som er av spesiell interesse innenfor rammen av den foreliggende oppfinnelsen.

- 10 I sin naturlige tilstand er lignin uløselig i vann og hydrofob. Når reagert med sulfitt blir lignin konvertert til sulfonert lignin (lignosulfonater) som har drastisk forskjellige egenskaper enn lignin. Introduksjonen av sulfonsyregrupper i lignin forandrer polymeren fra en nøytral til en anionisk uaktiv forbindelse av en av de sterkeste organiske syrene som er kjent, med en dissosieringskonstant på 0.3. I motsetning til naturlig
- 15 forekommende lignin, er sulfonert lignin som sådan nyttige ytelseskjemikalier eller kan bli konvertert til kommersielt levedyktige kjemikalier/materialer. Ligninkonverteringen til den foreliggende prosessen blir ikke oppnådd i noen andre av de kjente forbehandlingsprosessene, spesielt ikke i forbehandlingsprosessene kjent i sammenheng med biomassekonvertering. Den foreliggende prosessen tillater derfor produksjon av
- 20 verdifulle ytelseskjemikalier (sulfonert lignin) fra lignocellulosisk biomasse og spesielt fra ikke-trevirke-basert biomasse, f.eks. stilker, bagasse eller årlige planter.

- I forbehandlingstrinnet (i) til den foreliggende oppfinnelsen blir den lignocellulosiske biomassen kokt med en sulfitt, fortrinnsvis en natrium-, kalsium-, ammonium- eller magnesiumsulfitt under sure, nøytrale eller basiske betingelser. Dette
- 25 forbehandlingstrinnet løser opp mesteparten av ligninet som sulfonert lignin (lignosulfonat) sammen med deler av hemicellulosen. Denne oppløste eller flytende fasen (massedanningsvæske) er den flytende SSL-fasen (a) i trinn (ii). Cellulosen blir etterlatt nesten intakt i massen (b) sammen med deler av hemicellulosen.

- Anvendelsen av sulfittkoking som et forbehandlingstrinn i produksjon av drivstoff eller
- 30 kjemikalier fra fermenterbare sukkerer er veldig effektivt da det medfører høyere totalutbytter med kjemikalier. Kort sagt, et høyere utbytte ($> 80\%$) av nyttige kjemikalier blir oppnådd enn i noen annen kjent sukker-plattform bioraffineri-teknologi.

Spesielt blir det oppnådd lavere kostnader for hydrolysen basert på en forbehandling som effektivt separerer cellulose fra de andre bestanddelene, spesielt lignin, i ett trinn.

- 35 Det faktum at cellulosemassen som resulterer fra ett-trinns-forbehandlingen er spesielt lav i urenheter, spesielt lignin, gjør det lettere å utvikle eller tilpasse enzymer for hydrolysen.

- Også sulfitt-forbehandlingstrinnet til den foreliggende oppfinnelsen gjør det mulig med økt fleksibilitet i styringen av prosessen (pH fra 1 til 13) og når det gjelder i hvilken fase hemicellulosen ender opp (dvs. om hemicellulosen er hovedsakelig i den flytende SSL-fasen eller hovedsakelig i cellulosemassen). Sulfitt-forbehandlingstrinnet resulterer også i
- 40

økt fleksibilitet når det gjelder i hvilken form (monomerisk/polymerisk) hemicellulosen ender opp.

Sulfitt-forbehandlingen ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan bli utført ifølge en av de følgende foretrukne utførelsesformer. Deri og gjennom den foreliggende fremstillingen er "sulfitt-forbehandlingen" også referert til som "kok" (eng. «cook»):

- 5
- sur kok (fortrinnsvis SO_2 med et hydroksid, videre fortrinnsvis med $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NaOH , NH_4OH eller $\text{Mg}(\text{OH})_2$),
- bisulfittkok (fortrinnsvis SO_2 med et hydroksid, videre fortrinnsvis med NaOH , NH_4OH eller $\text{Mg}(\text{OH})_2$),
- 10
- svakt alkalisk kok (fortrinnsvis Na_2SO_3 , videre fortrinnsvis med Na_2CO_3) og
- alkalisk kok (fortrinnsvis Na_2SO_3 med et hydroksid, videre fortrinnsvis med NaOH).

En korrelasjon eksisterer mellom pH anvendt under koken og Kappa-tallet til den produserte massen, spesielt leder høye pH-verdier til lave Kappa-tall. Kappa-tallet er en indikasjon på lignin-innholdet eller blekbarheten til massen. Kappa-tallet angår lignin-innholdet til massen og kan bli brukt for å overvåke effektiviteten til ligningekstraksjonsfasen til massedannelsesprosessen. Tallet er typisk i området på 1 til 100 for en masse og blir bestemt ved å måle mengden av en standard kaliumpermanganat-løsning som blir konsumert av massen som blir vurdert. Detaljer om hvordan Kappa-tallet blir bestemt er gitt i ISO 302:2004.

For hver type av kok kan virkningen av flere kokevariabler sånn som temperatur, tid, forhold mellom væske og fast-stoff og mengde med kokekjemikalier bli brukt for å påvirke sammensetningen og egenskapene til massen, spesielt lignin-innhold og hemicellulose-innhold i henholdsvis masse-fasen og i den flytende SSL-fasen, (se Figur 1: "Masse"-fase og "SSL" flytende SSL-fase).

Sure koker resulterer i masser med et relativt høyt gjenværende lignin-innhold (15-40 %) i masse-fasen (Kappa-tall 50-100). Sure sulfitt-koker resulterer videre i sulfonerte ligniner som har en høy grad av sulfonering. Molekylvekten til det sulfonerte ligninet er også høyere sammenlignet med alkaliske sulfitt-koker. I løpet av sur sulfittkoking blir polysakkaridene delvis degradert, hovedsakelig ved hydrolyse av glykosidbindinger. Hemicellulosen er mer sensitiv for hydrolyse enn cellulosen. Imidlertid, i motsetning til papirlaging, kan denne delvise hydrolysen av (hemi)cellulose være fordelaktig i et bioraffineri hvor (hemi)cellulosen potensielt må bli hydrolysert og brutt ned allikevel.

En stor del (70 % eller mer) av hemicellulosen (hovedsakelig til stede som xylan) blir hydrolysert til monosakkarider, hovedsakelig til xylose, i løpet av koken og blir oppløst i kokevæsken, dvs. i den flytende SSL-fasen.

Derfor blir, ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen, en syrekok utført som forbehandlingstrinnet (i), hvor 70 % eller mer av den totale hemicellulosen fra den lignocellulosiske biomassen blir hydrolysert til xylose i trinn (i)

og er til stede i den flytende SSL-fasen (b) i trinn (ii), dvs. SSL'en som blir separert fra cellulosemassen i trinn (ii).

5 Ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen, er sulfittforbehandlingstrinnet en syrekok, videre fortrinnsvis en syrekok hvor temperaturen er i området fra 125 °C til 160 °C. Koker ved høyere temperaturer resulterer i lavere masseutbytter og mer omfattende degradering av monosakkaridene i SSL'ene. Det er derfor foretrukket å holde temperaturen til syrekoken ved eller under 160 °C.

10 Ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er sulfittforbehandlingstrinnet en syrekok og koken blir utført i et tidsintervall på 60 - 300 minutter.

Ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er sulfittforbehandlingstrinnet en syrekok og forholdet mellom væske-faststoff er fra 3:1 til 10:1.

15 Ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er sulfittforbehandlingstrinnet en syrekok og mengden av SO₂ er fra 10 til 60 % v/v, mens mengden med base (hydroksidion) er fra 1 til 10 % v/v, fortrinnsvis fra 2 % til 7 %. Med mindre annet er indikert angår "v/v" "vekt%" til komponenten i arbeidsvæsken i forhold til vekten av tørt råmateriale.

20 Ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er sulfittforbehandlingstrinnet en syrekok og det anvendte hydroksidet er valgt fra gruppen bestående av NaOH, Ca(OH)₂, Mg(OH)₂, NH₄OH. Natrium-koker gir generelt lavere Kappa-tall enn kalsium-koker.

Bisulfittkoker gir tilsvarende resultater som syrekoker men fører generelt til mindre karbohydratdegradering, høyere SSL-utbytter og, ved temperaturer over 150 °C, lavere Kappa-tall.

25 I bisulfittkok blir xylanet, oppløst i SSL'ene, bare hydrolysert til xylose i mindre utstrekning (mindre enn 40 %).

Med hensyn til bisulfittkoker gjelder de samme foretrukne områder for temperaturen, tidsintervallet og forholdet mellom væske-faststoff som beskrevet over for syrekoker.

30 Alkaliske og nøytrale masser som diskutert under er generelt lysere og lettere avvannet enn syre- og bisulfittmassene.

Alkaliske koker resulterer i masser med lavere mengder av gjenværende lignin (> 80 % av ligninet oppløst i SSL-fasen, Kappa ~10) og høyere xylan-innhold (< 50 % oppløst i kokevæsken). Xylanet oppløst i SSL'ene er hovedsakelig ikke hydrolysert til xylose.

35 Derfor, ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen, blir en alkalisk kok utført som forbehandlingstrinnet (i), hvor 80 % eller mer av det totale ligninet fra den lignocellulosiske biomassen er til stede i den flytende SSL-fasen (b), dvs. SSL'en som blir separert fra cellulosemassen i trinn (ii). Økte alkaliladninger resulterer typisk i masser med lavere Kappa-tall.

I alkalisk sulfittmassedannelse blir fortrinnsvis natriumhydroksid og natriumsulfitt brukt som reagenser. Alkalisk sulfittmassedannelse kombinerer to sterke delignifiseringsreagenser, sulfittioner og hydroksidioner, som således gir en effektiv delignifiseringsprosess. Det sulfonerte ligninet fra alkalisk sulfittmassedannelse vil ha en lavere molekylvekt og muligens være mindre sulfonert, grunnet redusert effektivitet hos sulfittionet med økt pH og økt effekt av hydroksidionene. Hemicelluloser kan bli fjernet gjennom oppløsning, dvs. opp til 50 % av xylanet kan bli oppløst i løpet av en alkalisk kok.

Imidlertid blir hoveddelen av xylanet, hvis massen og kokevæsken blir avkjølt før separasjon, re-utfelt på massen.

Ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er sulfittforbehandlingstrinnet en alkalisk kok, hvor, fortrinnsvis, temperaturen er i området fra 130 °C til 180 °C, eller fortrinnsvis fra 140 °C til 180 °C.

Ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er sulfittforbehandlingstrinnet en alkalisk kok og koken blir utført i et tidsintervall på 45 til 300 minutter.

Ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er sulfittforbehandlingstrinnet en alkalisk kok, videre fortrinnsvis en alkalisk kok hvor forholdet mellom væske-faststoff er fra 3:1 til 10:1.

Ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er sulfittforbehandlingstrinnet en alkalisk kok og mengden med Na_2SO_3 er fra 5 - 60 % v/v, mens mengden med base er fra 5 til 25 % v/v.

Ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er sulfittforbehandlingstrinnet en alkalisk kok og den anvendte basen er valgt fra gruppen bestående av NaOH eller NH_4OH (NH_3).

Å tilsette antrakinson til alkaliske koker forbedrer delignifiseringen og resulterer i en høyere grad av karbohydrater i massen. Derfor, hvis en alkalisk kok blir utført som sulfittforbehandlingstrinnet, er tilsetningen av antrakinson til kokevæsken foretrukket.

Svakt alkaliske koker gir masser tilsvarende de til de alkaliske kokene, men med noe mer gjenværende lignin og xylan.

I sammenheng med den foreliggende søknaden er "svakt alkalisk sulfittkok" definert som en kok med natriumsulfitt og natriumkarbonat. Hovedfordelene til disse kokene er de rådende karbohydratstrukturene, dvs. både cellulosen og hemicellulosen forblir hovedsakelig i massen.

Å tilsette antrakinson til svakt alkaliske koker forbedrer delignifiseringen og resulterer i en høyere grad av karbohydrater i massen. Derfor, hvis en svakt alkalisk kok blir utført som sulfittforbehandlingstrinnet er tilsetningen av antrakinson til kokevæsken foretrukket.

Ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er sulfittforbehandlingstrinnet en svakt alkalisk kok og temperaturen er i området fra 140 °C til 180 °C.

- 5 Ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er sulfittforbehandlingstrinnet en svakt alkalisk kok og koken blir utført i et tidsintervall på 45 til 300 minutter.

Ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er sulfittforbehandlingstrinnet en svakt alkalisk kok og forholdet mellom væske-faststoff er fra 3:1 til 10:1.

- 10 Ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er sulfittforbehandlingstrinnet en svakt alkalisk kok og mengden med Na_2SO_3 er fra 10 til 60 % v/v, mens mengden med Na_2CO_3 er fra 3 til 25 % v/v og fortrinnsvis fra 5 til 25 % v/v.

Utbyttet av cellulose og hemicellulose og graden av delignifisering er betydelig høyere for høy-pH koker (svakt alkalisk og alkalisk) enn for lav-pH koker (syre og bisulfitt).

- 15 Høy-pH kokene gir masser med betydelig høyere viskositet enn lav-pH kokene.

Derfor, ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen, er pH-verdien ved hvilken sulfittkoken i forbehandlingstrinnet (i) bli utført, høyere enn 5, fortrinnsvis høyere enn 7, videre fortrinnsvis høyere enn 9.

Separasjon av Masse og SSL

- 20 I trinn (ii) av prosessen ifølge den foreliggende oppfinnelsen, blir massen (fast fase; cellulose og hemicellulose) separert fra den brukte sulfittvæsken (flytende SSL-fase; SSL, sulfonert lignin og hemicellulose) ved enhver separasjonsmetode kjent for fagpersonen; spesielt pressing, filtrering, sedimentering eller sentrifugering.

- 25 I trinn (ii) resulterer separasjonen i en flytende SSL-fase. Den organiske delen av SSL'en omfatter hovedsakelig lignin (sulfonert lignin), dvs. omfatter i det minste 60 % eller mer av ligninet som til å begynne med er til stede i den lignocellulosiske biomassen, fortrinnsvis mer enn 70 % eller mer enn 80 %. Videre fortrinnsvis blir en alkalisk kok utført i trinn (i) og 80 % eller mer eller 90 % eller mer eller 95 % eller mer av ligninet som til å begynne med er til stede i den lignocellulosiske biomassen er til stede i den flytende SSL-fasen etter trinn (ii).
- 30

I en foretrukket utførelsesform, da et (høy-utbyttes) sulfittforbehandlingstrinn blir utført i trinn (i), resulterer separasjonstrinnet (ii) i 60 % eller mer, fortrinnsvis 75 % eller mer, videre fortrinnsvis 90 % eller 95 % eller mer av cellulosen som til å begynne med var til stede i den lignocellulosiske biomassen er i masse-fasen.

- 35 *Hydrolyse*

Ifølge trinn (iii) av den foreliggende prosessen blir massen som separert i trinn (ii) hydrolysert. Massen blir hydrolysert ved enzymer eller ved mikrobisk degradering.

Cellulose er en uløselig lineær polymer av repeterende glukose (eller mer riktig cellobiose) enheter knyttet sammen med β -1-4-glukosidbindinger. I vann blir cellulose hydrolysert ved angrep, av det elektrofile hydrogenet til vannmolekylet, på glykosidbindingen.

- 5 Hastigheten på reaksjonen kan bli økt ved bruk av hevede temperaturer og trykk eller kan bli katalysert ved fortynnet eller konsentrert syre eller ved enzymer.

• *Enzym-hydrolyse*

10 I cellulosekjeder har hver glukose-enhet potensialet for å danne tre hydrogenbindinger med monomere i sideliggende kjeder, som gir en stabil krystallinsk struktur som er motstandsdyktig for hydrolyse.

15 Ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen, ekstracellulære eller celle-membran assosierte enzym-komplekser (cellulaser) som kan spesifikt hydrolysere cellulose-polymeren til løselige glukose-monomere blir anvendt i hydrolysetrinn (iii). Cellulaser er multi-protein komplekser bestående av synergistiske enzymer med forskjellige spesifikke aktiviteter som kan bli delt opp i exo- og endo-cellulaser (glukanase) og β -glukosidase (cellobiase). I tillegg finnes det enzymer (hemicellulaser, laccaser, lignolytiske peroksidaser osv.) som kan bryte ned de andre hovedkomponentene til lignocellulosisk biomasse. Alle disse enzymer og enhver kombinasjon derav er foretrukne enzymer som kan bli anvendt i den enzymatiske hydrolysen i trinn (iii).

25 Cellobiose er en kjent sluttproduktinhibitor av glukanaser og β -glukosidase er kjent for å minske denne inhiberingen ved å konvertere cellobiose til glukose (hastighetsbegrensende trinn). I industrielle prosesser, f.eks. etanolfermentering ved gjær, cellulasesakkarifiseringseffektivitet kan bli forbedret ved samtidig sakkarifisering og fermentering (SSF). Den største utfordringen med SSF er de forskjellige temperaturoptima for vanlige hydrolytiske enzymer og fermenteringsorganismer. I tillegg til inhibering av sluttprodukt er lignin kjent å redusere enzymytelse ved å binde ikke-spesifikt til cellulaser.

30 Både sur og enzymatisk hydrolyse av cellulose er begrenset ved den sterkt krystallinske egenskapen til cellulose. Fordelene med enzymatisk hydrolyse i forhold til sur hydrolyse er anvendelsen av milde betingelser og minimal dannelse av degraderingsprodukter, mens ulemper kan være sakte og dyr prosessering. Forbehandling av cellulosen er essensielt for å øke det spesifikke overflatearealet til cellulosen og for å redusere krystalliniteten. Riktig forbehandling har fordelene av å øke enzymhydrolysehastigheten grunnet mer tilgjengelig substrat og også ved å fjerne potensielle inhiberende substanser som nevnt over.

Ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er hydrolysetrinn (iii) et enzymatisk hydrolysetrinn.

40 Ifølge en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen blir enzymene resirkulert, fortrinnsvis ved substratadsorpsjon og/eller membranseparasjon.

• *Svakt sur hydrolyse*

5 Sur hydrolyse er en billig og rask metode for å oppnå monosakkarider fra cellulose og hemicellulose, men genererer noen degraderingsprodukter. Kraftige sure hydrolysebetingelser (høy temperatur eller høy syrekonsentrasjon) degraderer monosakkaridene til furfural og 5-hydroksymetylfurfural (HMF) og til alifatiske syrer (sånn som AcOH, HCOOH og levulinsyre). Imidlertid kan svakt sur hydrolyse under visse omstendigheter være nyttig som et ytterligere hydrolysetrinn.

En konsentrert sur hydrolyse blir fortrinnsvis utført ved temperaturer fra 20 °C til 100 °C, og en syrestyrke i området på 10 % til 30 %. Fortrinnsvis blir svovelsyre anvendt. Prosessen krever korrosjonsmotstandsdyktig utstyr og gjenvinning av syren.

10 Fortynnet sur hydrolyse er en enklere prosess, men behøver høyere temperaturer (100 °C to 230 °C) og trykk. Forskjellige typer syrer, med konsentrasjoner i området 0 % til 5 %, blir fortrinnsvis anvendt (f.eks. eddiksyre, HCl eller svovelsyre). En fortynnet syreprosess behøver trykktolerant utstyr.

15 *Fermentering*

Trinn (iv) av den foreliggende prosessen angår fermenteringen av monosakkarider, spesielt av heksosier og pentosier til etanol eller andre sukkerbaserte kjemikalier eller for å produsere biomasse-proteiner.

20 Fermentering involverer mikroorganismer som bryter ned sukkere ved frigiving av energi mens prosessen resulterer i produkter som en alkohol eller en syre. *Saccharomyces cerevisiae* (Bakers gjær) blir oftest anvendt for å fermentere heksosier til etanol. Ett mol med glukose vil støkiometrisk gi 2 mol med etanol pluss 2 mol med karbondioksid. Bagasse-masse inneholder relativt store mengder med pentosier. Disse sukkere kan også enten bli fermentert eller metabolisert for å produsere biomasse-proteiner.

25 Ifølge en utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen blir bagasse brukt som råmaterialet og fermenteringstrinn (iv) omfatter metaboliseringen av hydrolysatet fra trinn (iii) til biomasse-proteiner.

Lignosulfonat-prosessering

30 Ifølge trinn (v) av den integrerte prosessen ifølge den foreliggende oppfinnelsen, blir den flytende SSL-fasen (a) fra trinn (ii), dvs. SSL'en omfattende 50 % eller mer eller 60 % eller mer eller 70 % eller mer eller 80 % eller mer av ligninet i råmaterialet, prosessert til rensert sulfonert lignin (lignosulfonater) og andre produkter. Hovedtrinnet i prosesseringen kan være, for eksempel, fermentering, ultrafiltrering, sukkerdestruksjon, utfelling osv. Andre trinn kan inkludere tørking, fordamping, stripping og nøytralisering osv.

40 Sulfonert lignin (lignosulfonater) kan bli brukt i en lang rekke anvendelser, inkludert men ikke begrenset til kjemikalier, batterifyllstoff, «bypass»-proteiner, dispersjoner av sort karbon, sement, keramikk, betongblandinger, emulsjoner, gjødningsmidler, gipsplater, humussyre, industrielle bindemidler, industrielle vaskemidler & vannbehandlingstilsetningsstoffer, jordforbedrere, mikronæringsstoffer, gruvedrift og

mineralprosessering, oljefelt-kjemikalier, pelleteringsytelsesforsterkere og vei & jordstøvs kontroll, blant annet.

Valgfri ytterligere delignifisering

- 5 I en foretrukket utførelsesform og med det formål å videre redusere mengden av lignin i den faste fasen (masse, eng. "masse"), kan et oksygen/alkali delignifiseringstrinn (ekstraksjonstrinn) (i') være en del av den totale integrerte prosessen. Dette valgfrie ekstraksjonstrinnet (i') blir fortrinnsvis utført etter forbehandlingstrinnet (i) og før separasjonstrinnet (ii).

Å ekstrahere mer lignin har fordelene av økt lignosulfonatproduksjon.

- 10 Nevnte ytterligere delignifisering blir fortrinnsvis vurdert for masser som kommer fra den sure sulfittprosessen da disse massene har forholdsvis høyt lignininnhold. Oksygen-delignifisering (10 % NaOH ladning, 6 bar oksygen) kan gi en 58-enheters (70 til 12) Kappa-tall reduksjon for en sur sulfittkøkt masse. Det sulfonerte ligninet ekstrahert i løpet av delignifiseringen (omtrent 25 % av det sulfonerte ligninet ekstrahert i løpet av koken) har dispergerende evner.
- 15

Ligninfjernende oksygen/alkali delignifisering er det foretrukne ytterligere delignifiseringstrinnet. I løpet av oksygen-delignifisering blir massen utsatt for oksygentrykk ved høy pH og hevet temperatur.

Eksempler

- 20 Det følgende gjelder generelt gjennom hele spesifikasjonen og også for kravene:

"TS" betegner "Totale faste masser" og er forholdet mellom vekten til en prøve etter at den har blitt tørket ved 105 °C i 16 timer, og dens originale vekt;

Temperatur er gitt i °C

"v" betegner vekt;

- 25 "%" betegner "vekt%" hvis ikke annet er spesifisert;

"V/v" betegner "volum i mL" på vekt i g hvis ikke annet er spesifisert.

Eksempel 1 - Alkalisk sulfittkok, enzymatisk hydrolyse

- 30 Bagasse [82% TS (Totale faste masser)] ble brukt som råstoff. Råstoffet ble blandet med en kokevæske bestående av 6 % NaOH (v/v tilsetning) og 24 % Na₂SO₃ (v/v tilsetning) med et forhold mellom væske og fast stoff på 6 til 1.

Blandingen ble varmet til 170 °C med en temperaturøkning på 1.6 °C /min. Koken ble holdt ved 170 °C i 60 min.

Etter koken, dvs. etter forbehandlingstrinnet ifølge den foreliggende oppfinnelsen, ble det faste stoffet (masse, 51% av TS) og væsken (SSL, 49% of the TS) separert ved filtrering. Massen besto av cellulose tilsvarende 57 % glukose, xylan tilsvarende 24 % xylose, 2 % andre karbohydrater, 5 % lignin, 4 % aske og 8 % ikke-definerte komponenter.

5 SSL'en hadde et karbohydratinnhold på 11 % (xylan tilsvarende 6,4% xylose) på TS. Innholdet av organisk svovel i SSL'en var 5.7 % på TS. Resten av SSL'en var sulfonert lignin (lignosulfonat) og uorganisk materiale. Etter fordamping ble SSL'en testet for forskjellige anvendelser og viste seg å være sammenlignbar med eksisterende kommersielle produkter.

10 I de videre prosesstrinn med hensyn til cellulosemassen ble nevnte masse enzymatisk hydrolysert med 0,7 % (v protein/v tilsetning) enzymer (0,5 % cellulase, 0,05 % β -glukosidase og 0,15 % xylanase) ved 50 °C i 48 timer. Dette resulterte i et utbytte på 92 % med hensyn til glukose og 90 % med hensyn til xylose. Væsken (hydrolysat) ble separert fra den faste fasen ved sentrifugering.

15 **Eksempel 2 - Sur sulfittkok, enzymatisk hydrolyse**

20 Bagasse (82 % TS) ble brukt som råstoff. Råstoffet ble blandet med en kokevæske med 35 % SO₂ (v/v tilsetning) og 3.1 % hydroksidion (v/v tilsetning), NaOH ble brukt som base. Forholdet mellom væske og fast stoff var 6 til 1. I nevnte forbehandlingstrinn ble blandingen varmet til 140 °C med en temperaturøkning på 1.9 °C /min og en stopp ved 105 °C i 30 min. Koken ble holdt ved 140 °C i 180 min.

Etter koken ble det faste stoffet (masse, 45 % av TS) og væske (SSL, 55 % av TS) fasene separert ved filtrering. Massen besto av cellulose, tilsvarende 79 % glukose, xylan, tilsvarende 6% xylose, 1% andre karbohydrater, 11% lignin, 3% aske.

25 SSL'en hadde et karbohydratinnhold på 25 % (19 % xylose) på TS. Innholdet av organisk svovel i SSL'en var 4.6 % på TS. Etter fordamping ble SSL'en testet for forskjellige anvendelser og viste seg å være sammenlignbar med eksisterende kommersielle produkter.

30 I hydrolysetrinnet etter forbehandling ble massen enzymatisk hydrolysert med 0,55 % (v protein/v tilsetning) enzymer (0.5 % cellulase, 0.05 % β -glukosidase) ved 50 °C i 48 timer. Dette resulterte i et utbytte på 96 % med hensyn til glukose og 75 % med hensyn til xylose. Væsken (hydrolysat) ble separert fra den faste fasen ved sentrifugering.

Eksempel 3 - Svakt alkalisk sulfittkok, enzymatisk hydrolyse

35 Bagasse (91.4 % TS) ble brukt som råstoff. Råstoffet ble blandet med en kokevæske bestående av 6 % Na₂CO₃ (v/v tilsetning) og 16 % Na₂SO₃ (v/v tilsetning) med et forhold mellom væske og fast stoff på 6 til 1.

Blandingens ble varmet til 160 °C med en temperaturøkning på 1.3 °C/min. Koken ble holdt ved 160 °C i 180 min.

Etter koken ble det faste stoffet (masse, 53 % av TS) og væsken (SSL, 47% av TS) separert ved filtrering. Massen besto av cellulose tilsvarende 63 % glukose, xylan tilsvarende 27 % xylose, 2 % andre karbohydrater, 5 % lignin og 3 % aske.

- 5 SSL'en hadde et karbohydratinnhold på 7.5 % (xylan tilsvarende 4.7 % xylose) på TS. Resten av SSL'en var sulfonert lignin (lignosulfonat) og uorganisk materiale.

- 10 I de videre prosesseringstrinn av cellulosemassen ble nevnte masse enzymatisk hydrolysert med to forskjellig substratkonsentrasjoner 5 og 10 % v/v. To forskjellige enzymformuleringer ble anvendt for sakkarifiseringen, Novozymes Celluclast system, (5 % "Celluclast 1.5L", 0,5 % β -glukosidase "Novozym 188" og 1% xylanase "Shearzyme" alle i V/vekt masse) og Genencors Accellerase 1500 system (24 % V/vekt masse) begge formuleringene ble testet ved pH 5 (5 mM sitratbuffer) inkubert ved 50 °C i 72 timer. Prøver ble tatt ved 6, 24, 48 og 72 timer. Resultatene er gitt i Tabell 1.

Tabell 1. Resultater av enzymatisk hydrolyse svakt alkalisk kok, eksempel 3.

Utbytte %	6 timer		24 timer		48 timer		72 timer	
	Glukose	Xylose	Glukose	Xylose	Glukose	Xylose	Glukose	Xylose
Svakt alkalisk 5 % masse- konsentrasjon (Celluclast)	22,1	31,0	50,3	63,3	71,4	90,0	81,0	90,0
Svakt alkalisk 5 % masse- konsentrasjon (Accellerase)	35,3	52,2	56,8	53,8	61,5	58,7	69,5	65,2
Svakt alkalisk 10 % masse- konsentrasjon (Celluclast)	13,9	24,6	38,4	57,1	61,0	76,3	67,0	76,3
Svakt alkalisk 10 % masse- konsentrasjon (Accellerase)	22,1	22,8	44,8	49,9	49,4	48,9	54,7	57,9

Eksempel 4 - Sur sulfittkok II, enzymatisk hydrolyse

5 Bagasse (91.4 % TS) ble brukt som råstoff. Råstoffet ble blandet med en kokevæske med 47 % SO₂ (v/v tilsetning) og 3.8 % hydroksidion (v/v tilsetning). NaOH ble brukt som base. Forholdet mellom væske og fast stoff var 6 til 1. I nevnte forbehandlingstrinn ble blandingen varmet til 140 °C med en temperaturøkning på 1.5 °C/min. Koken ble holdt ved 140 °C i 120 min.

Etter koken ble de faste stoff (masse, 47% of the TS) og væske (SSL, 53% of the TS) fasene separert ved filtrering. Massen besto av cellulose tilsvarende 79 % glukose, xylan tilsvarende 8 % xylose, mindre enn 1 % andre karbohydrater, 11 % lignin og 2 % aske.

10 SSL'en hadde et karbohydratinnhold på 22.8 % (20.2 % xylose) basert på TS. Innholdet av organisk svovel i SSL'en var 4.6 % basert på TS.

15 I det videre prosesstrinnet med hensyn til cellulosemassen ble nevnte masse enzymatisk hydrolysert med to forskjellige substratkonsentrasjoner 5 og 10 % v/v. To forskjellige enzymformuleringer ble anvendt for sakkarifiseringen, Novozymes Celluclast system, (5 % "Celluclast 1.5L", 0.5 % β-glukosidase "Novozym 188" og 1 % xylanase "Shearzyme" all i V/w masse) og Genencors Accellerase 1500 system (24% V/w masse) both formuleringer ble testet ved pH 5 (5 mM sitratbuffer) inkubert i 50 °C i 72 timer. Prøver ble tatt ved 6, 24, 48 og 72 timer. Resultatene er gitt i Tabell 2 og viser at prosessen ifølge oppfinnelsen virker bra med forskjellige typer av enzymer.

Tabell 2. Resultater enzymatisk hydrolyse sur kok II, eksempel 4.

20

Utbytte %	6 timer		24 timer		48 timer		72 timer	
	Glukose	Xylose	Glukose	Xylose	Glukose	Xylose	Glukose	Xylose
Sur 5 % masse- konsentrasjon (Celluclast)	21,9	33,3	46,0	52,6	61,7	66,3	61,7	66,3
Sur 5 % masse- konsentrasjon (Accellerase)	33,3	34,6	48,7	52,4	50,5	57,2	57,8	66,3
Sur 10 % masse- konsentrasjon (Celluclast)	17,0	26,8	40,0	50,8	49,8	54,2	49,7	56,5
Sur 10 % masse- konsentrasjon (Accellerase)	23,5	24,8	48,2	48,5	51,3	54,2	54,7	58,8

Eksempel 5 - Svakt alkalisk og sur sulfittkoking av strå, enzymatisk hydrolyse

5 Norsk strå (92.5 % TS) ble brukt som råstoff. Råstoffet ble delt i to deler. Del en ble blandet med en kokevæske bestående av 16 % Na₂SO₃ (v/v tilsetning) og 6 % Na₂CO₃ (v/v tilsetning). I nevnte forbehandlingstrinn ble blandingen varmet til 160 °C med en temperaturøkning på 2 °C /min. Koken ble holdt ved 160 °C i 120 min.

10 Del to ble blandet med en kokevæske med 36.1 % SO₂ (v/v tilsetning) og 3.8 % hydroksidion (v/v tilsetning), NaOH ble brukt som base. I nevnte forbehandlingstrinn ble blandingen varmet til 132 °C med en temperaturøkning på 1.8 °C /min. Koken ble holdt ved 132 °C i 180 min.

Forholdet mellom væske og fast stoff var 6:1 for begge kokene.

15 Etter koken (svakt alkalisk/sur) ble det faste stoffet (masse, 49/45 % av TS) og væske (SSL, 51/55 % av TS) fasene separert ved filtrering (bare de tørre faste stoffene ble tatt hensyn til ved bestemmelsen av prosentandelene). Massen besto av cellulose tilsvarende 63/81 % glukose, xylan tilsvarende 25/10 % xylose, mindre enn 1 % andre karbohydrater, 7/15 % lignin og 2/0 % ikke-definerte komponenter.

SSL'en hadde et karbohydratinnhold på 14.3/21.1 % (xylan tilsvarende 8.5 % xylose/16.7% xylose) på TS.

20 I det videre prosesstrinnet med hensyn til cellulosemassen ble nevnte masse enzymatisk hydrolysert ved en substratkonsentrasjon på 8 % v/v. En enzymformulering, Novozymes Celluclast system, (10 % "Celluclast 1.5L", 15 % β-glukosidase "Novozym 188" og 2 % xylanase "Shearzyme" alle i V/vekt masse) ble testet ved pH 5 (5 mM sitratbuffer) inkubert i 50 °C i 24 timer. Prøver ble tatt etter 24 timer. Anvendelsen av den svakt alkalisk kokte prøven resulterte i et utbytte på 62 % glukose og 68 % xylose.

25 Anvendelsen av den surt kokte prøven resulterte i et utbytte på 60 % glukose og 78 % xylose.

Eksempel 6 - Sur, svakt alkalisk og alkalisk sulfittkoking av bagasse, enzymatisk hydrolyse

30 Et sett på 25 sure, svakt alkaliske og alkaliske koker ble utført, bagasse (65 % TS) ble brukt som råstoff. Betingelser som dekker et bredt område ble testet. Syrekoker: 20- 50 % SO₂ (v/v tilsetning) og 2-8 % hydroksidion (v/v tilsetning), NaOH ble brukt som base. Koketemperaturen varierte fra 125-160 °C og tid fra 60 - 180 min. Svakt alkaliske koker: Na₂SO₃ 10-40 % (v/v tilsetning) og Na₂CO₃ 5-25 % (v/v tilsetning). Koketemperaturen varierte fra 140-180 °C og koketid fra 60 - 180 min. Alkaliske koker: Na₂SO₃ 10-40 %

35 (v/v tilsetning) og NaOH 5-30 % (v/v tilsetning). Koketemperaturen varierte fra 140-180 °C og tid fra 60 - 180 min.

Kokene resulterte i 25 forskjellige masser med en varierende mengde gjenværende lignin 1.6-51 % (Kappa-tall 8-102)

40 I det videre prosesstrinnet med hensyn til massen ble nevnte masse enzymatisk hydrolysert ved en substratkonsentrasjon på 2 % v/v. En enzymformulering, Novozymes

Celluclast system, (5 % "Celluclast 1.5L", 0.5 % β -glukosidase "Novozym 188" og 1 % xylanase "Shearzyme" alle i V/vekt masse) ble testet ved pH 5 (5 mM sitratbuffer) inkubert ved 50 °C i 48 timer. Glukoseutbytte som et plot av Kappa-tall (gjenværende lignin) er presentert i Figur 3. Resultatene i Figur 3 viser at det ikke er noen tydelig korrelasjon mellom fordøybarheten av massene og deres lignininnhold (Kappa-tall). Med andre ord, til tross for det faktum at det gjenværende innholdet varierer betydelig fra lavt til høyt, har ikke dette noen merkbar effekt på utbyttet, som varierer mellom 60 % og 100 % (verdier > 100 % er grunnet avvikssøylen) uten noen korrelasjon med Kappa. Dette er trodd å være på grunn av "deaktivering" av lignin av sulfittprosessen som beskrevet over.

Eksempel 7 - Etanolvermentering

Fermentering ble utført ved bruk av Bakers gjær (*Saccharomyces cerevisiae*) i 2 L Biostat B plus fermentorer (Sartorius Stedium) som «batch»-kulturer under kontrollerte betingelser.

Agar-plater med YPD [gjærekstrakt (10 g/l), pepton (20 g/L), dekstrose (20 g/L), agar (20 g/L)] ble anvendt for å vedlikeholde stammen. En enkelt koloni ble valgt ut og til å begynne med inokulert i 100 ml YPD media og inkubert over natten ved 34 °C og 200 rpm. Kulturen ble cryobevart i 30 % glyserol ved -80 °C i 10 ml alikvoter. En opptint alikvot ble brukt som podestoff for en startkultur som ble grodd i 600 ml YPD-medium over natten. Cellene ble høstet ved sentrifugering, vasket med natriumkloridløsning (9 g/L) og sentrifugert.

Hydrolysater fremstilt ifølge prosedyrene i Eksempler 3 og 4 over ble endret med næringsløsning [(NH₄)₂SO₄ (0.44 g/L), KH₂PO₄ (2.0 g/L) og MgSO₄ (0.50 mg/L)] og 1.0 g/L med gjærekstrakt og pH ble justert til 4.6. En pellet med podestoff (justert for å gi en innledende biomasse-konsentrasjon på ~2 g l⁻¹ tørrvekt) ble suspendert deri. Glukosenivået i løpet av fermenteringen ble overvåket ved å bruke et glukometer (Glucometer Elite, Bayer AG, Germany). Prøver tatt fra fermentorene ble sentrifugert ved 13000 g i 1 min. Supernatanten ble filtrert gjennom et HPLC-filter (0.45 μ m GHP Acrodisc 13 mm sprøytefilter) og analysert for innhold av glukose (ione-kromatografi) og etanolkonsentrasjon (gass-kromatografi).

Hydrolysaten, oppnådd ved å bruke prosedyrene i Eksempler 3 og 4, ga begge en utbytte-koeffisient på 0.50 (g etanol / g glukose).

Sammenligningseksempler

Sammenligningseksempel I – Soda-koker, enzymatisk hydrolyse

Bagasse (91.4 % TS) ble brukt som råstoff. Råstoffet ble blandet med kokevæske bestående av 16 % NaOH (v/v tilsetning) med et forhold mellom væske og fast stoff på 6 til 1.

Soda-kok I:

Blandingen ble varmet til 160 °C med en temperaturøkning på 1.3 °C / min. Koken ble holdt ved 160 °C i 180 min.

Soda-kok II:

Blandingen ble varmet til 140 °C med en temperaturøkning på 1.5 °C / min. Koken ble holdt ved 140 °C i 120 min.

5 Etter koken ble det faste stoffet (masse, 48/52 % av TS) og væsken (svart væske, 52/48 % av TS) separert ved filtrering (bare de tørre faste stoffene blir tatt hensyn til ved bestemmelse av prosentandelene). Massen besto av cellulose tilsvarende 68/65 % glukose, xylan tilsvarende 26/26 % xylose, 2/2 % andre karbohydrater, 4/5 % lignin, 2/2 % aske.

10 SSL'en hadde et karbohydratinnhold på 9.6/9.2 % (5.7/5.9 % xylose) basert på tørr substans. Resten av den svarte væsken var degradert lignin, alifatiske syrer og uorganiske substanser.

15 I det videre prosesstrinnet med hensyn til cellulosemassen ble nevnte masse enzymatisk hydrolysert med to forskjellige substratkonsentrasjoner 5 og 10 % v/v. Novozymes Celluclast system, (5 % "Celluclast 1.5L", 0.5 % β -glukosidase "Novozym 188" og 1 % xylanase "Shearzyme" alle i V/vekt masse) ble testet ved pH 5 (5 mM sitratbuffer) inkubert ved 50 °C i 72 timer. Prøver ble tatt ved 6, 24, 48 og 72 timer, resultater er vist i Tabell 3.

Tabell 3. Resultater av enzymatisk hydrolyse av soda-kok I og II, Sammenligningseksempel I.

Utbytte %	6 timer		24 timer		48 timer		72 timer	
	Glukose	Xylose	Glukose	Xylose	Glukose	Xylose	Glukose	Xylose
Soda I 5 % masse- konsentrasjon	12,8	19,8	29,4	43,0	48,0	61,8	48,3	62,4
Soda I 10 % masse- konsentrasjon	4,3	11,3	12,7	34,4	26,4	60,1	47,1	61,6
Soda II 5 % masse- konsentrasjon	12,9	19,7	28,9	43,2	46,9	60,9	54,8	63,9
Soda II 10 % masse- konsentrasjon	6,5	12,2	10,7	33,6	21,5	57,4	30,1	54,2

20

Tolkning av sammenligningseksempel I og Eksempler 3 og 4

25 Når forbehandlingsmetoden ifølge den foreliggende oppfinnelsen blir sammenlignet med en konvensjonell soda-kok kan flere forskjeller bli observert. Den krevde fremgangsmåten genererer en væske-fraksjon (SSL) som lett kan omdannes til produkter med vidt forskjellige egenskaper. Når det andre trinnet (hydrolyse/sakkarifisering) av

fremgangsmåten blir gransket er det en tydelig forskjell i fordøybarhet mellom soda- og sulfittkokte prøver, se Figur 4.

5 Det kan tydelig sees at den sulfitt-forbehandlede bagassen er mye lettere å hydrolysere enn den soda-kokte bagassen. Før den foreliggende oppfinnelsen var fordommen i teknikken at det er en direkte korrelasjon mellom enzymatisk fordøybarhet og mengden lignin for de forbehandlede materialene (se, for eksempel: Mooney CA. et al., 1998, "The effect of the initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolyses of soft wood", *Biores. Technol.* 64, 2, 113-119, og Lu Y. et al., 2002. "Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolyses of damp-exploded soft wood residues", *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98-100, 641-654.). Sulfitt-forbehandlingen 10 resulterer i mer lett hydrolyserte masser enn soda-kokene, til tross for det faktum at lignin-innholdet er lavere i soda-kokene. Denne oppdagelsen indikerer sterkt at lignin-innholdet ikke er en hastighetsbestemmende faktor for hydrolysen av sulfittforbehandlet materiale. Dette har tidligere ikke blitt sett for delignifiserende forbehandlinger og var 15 ikke forventet.

Krav

1. Fremgangsmåte for produksjon av monosakkarider, sukkerbaserte kjemikalier, biodrivstoff eller materialer sammen med sulfonert lignin fra lignocellulosisk biomasse omfattende i det minste de følgende trinn:
 - 5 (i) forbehandling av en lignocellulosisk biomasse i et sulfittkoketrinn;
 - (ii) separasjon av den forbehandlede lignocellulosiske biomassen fra trinn (i) til
 - (a) en flytende «brukt sulfittvæske»-fase omfattende 60 % eller mer av ligninet til den lignocellulosiske biomassen i form av sulfonert lignin, og til
 - 10 (b) en masse omfattende 70 % eller mer av cellulosen til den lignocellulosiske biomassen;
 - (iii) hydrolyse av massen (b) fra trinn (ii) til en sukkerkjemi-plattform omfattende monosakkarider;
 - (iv) eventuelt ytterligere prosessering av monosakkaridene fra trinn (iii) som gir nyttige kjemikalier, biodrivstoff og/eller proteiner; og
 - 15 (v) direkte konvertering eller ytterligere prosessering av det sulfonerte ligninet i den flytende fasen (a) fra trinn (ii) til nyttige kjemikalier og/eller materialer, karakterisert ved at hydrolysetrinn (iii) er et enzymatisk hydrolysetrinn.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor monosakkaridene omfatter heksosier og pentosier.
3. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de forutgående krav, hvor den
 - 20 lignocellulosiske biomassen omfatter trevirke, årlige planter, jordbruksrester eller -avfall, spesielt bagasse eller energivekster, og/eller hvor den lignocellulosiske biomassen anvendt i prosessen ikke krever mekanisk (for)behandling og/eller hvor sulfittkoketrinnet (i) er den eneste kjemiske (for)behandlingen før hydrolyse.
4. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de forutgående krav, hvor den organiske
 - 25 delen av den flytende SSL-fasen hovedsakelig omfatter lignin i form av sulfonert lignin, dvs. omfatter i det minste 70 % av ligninet som til å begynne med er til stede i den lignocellulosiske biomassen.
5. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de forutgående krav, hvor pH-verdien ved hvilken sulfittkoket til forbehandlingstrinnet (i) blir utført er høyere enn 5.
6. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de forutgående krav, hvor en syrekok blir
 - 30 utført som den eneste kjemiske forbehandling.
7. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de forutgående krav, hvor sulfittforbehandlingstrinnet er en syrekok og mengden av SO₂ er fra 10 til 60 % v/v og mengden av base (hydroksidion) er fra 1 til 10 % v/v.

8. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av krav 1 -5, hvor sulfittforbehandlingstrinnet er en alkalisk kok.
9. Fremgangsmåte ifølge krav 8, hvor mengden av Na_2SO_3 er fra 5 - 60 % v/v, mens mengden base er fra 5 til 25 % v/v.
- 5 10. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av krav 1 - 5, hvor sulfittforbehandlingstrinnet er en svakt alkalisk kok.
11. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de forutgående krav, hvor hydrolysetrinn (iii) er et enzymatisk hydrolysetrinn som anvender ekstracellulære eller cellemembran-assosierte enzym-komplekser.
- 10 12. Fremgangsmåte ifølge krav 11 hvor hydrolysetrinn (iii) er et enzymatisk hydrolysetrinn og enzymer blir resirkulert.
13. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de forutgående krav, hvor bagasse blir brukt som råmaterialet og fermenteringstrinn (iv) omfatter metaboliseringen av hydrolysatet fra trinn (iii) til biodrivstoff sånn som etanol og butanol, og hvor bagasse
- 15 blir brukt som råmaterialet og fermenteringstrinn (iv) omfatter metaboliseringen av hydrolysatet fra trinn (iii) til biomasseproteiner.
14. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de forutgående krav, hvor et oksygen/alkali-delignifiseringstrinn (i') er del av den totale integrerte fremgangsmåten.

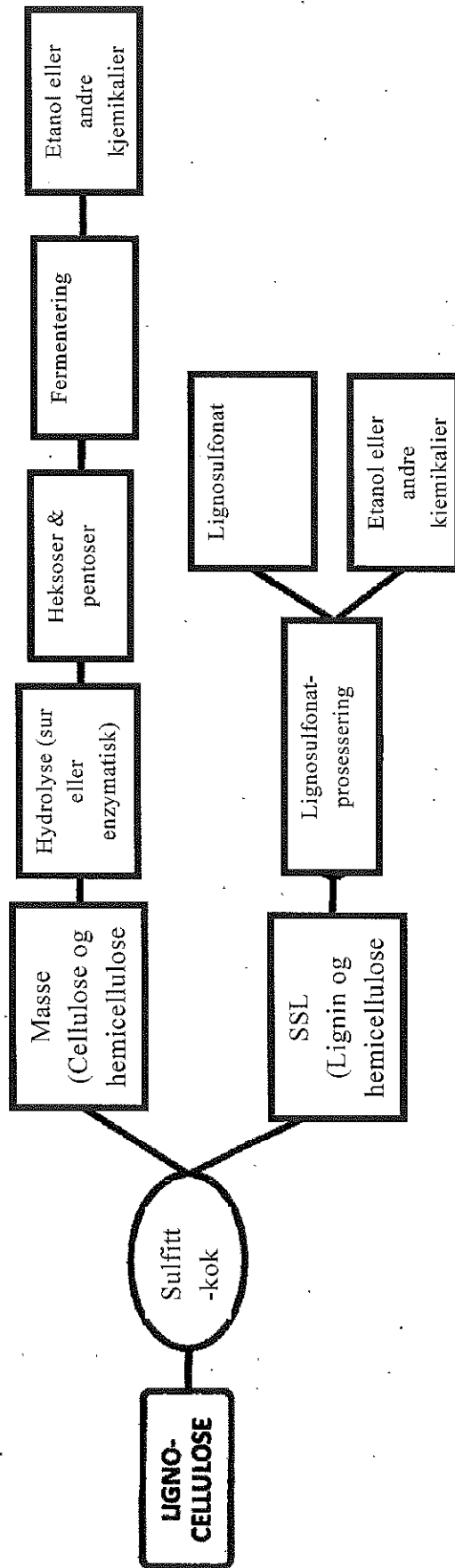


Fig. 1

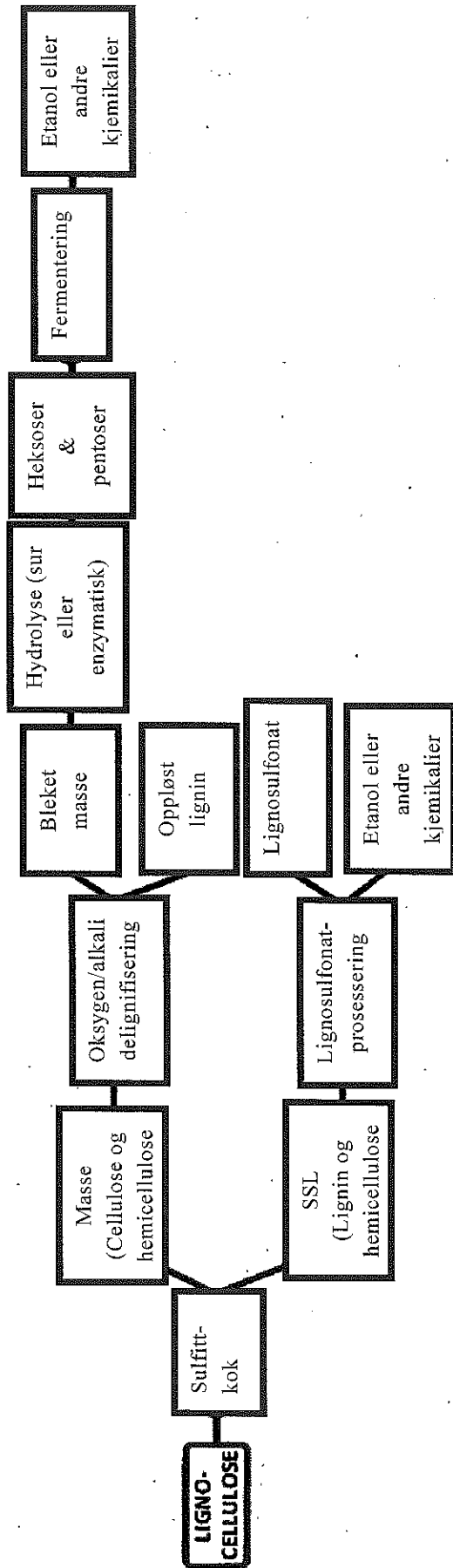


Fig. 2

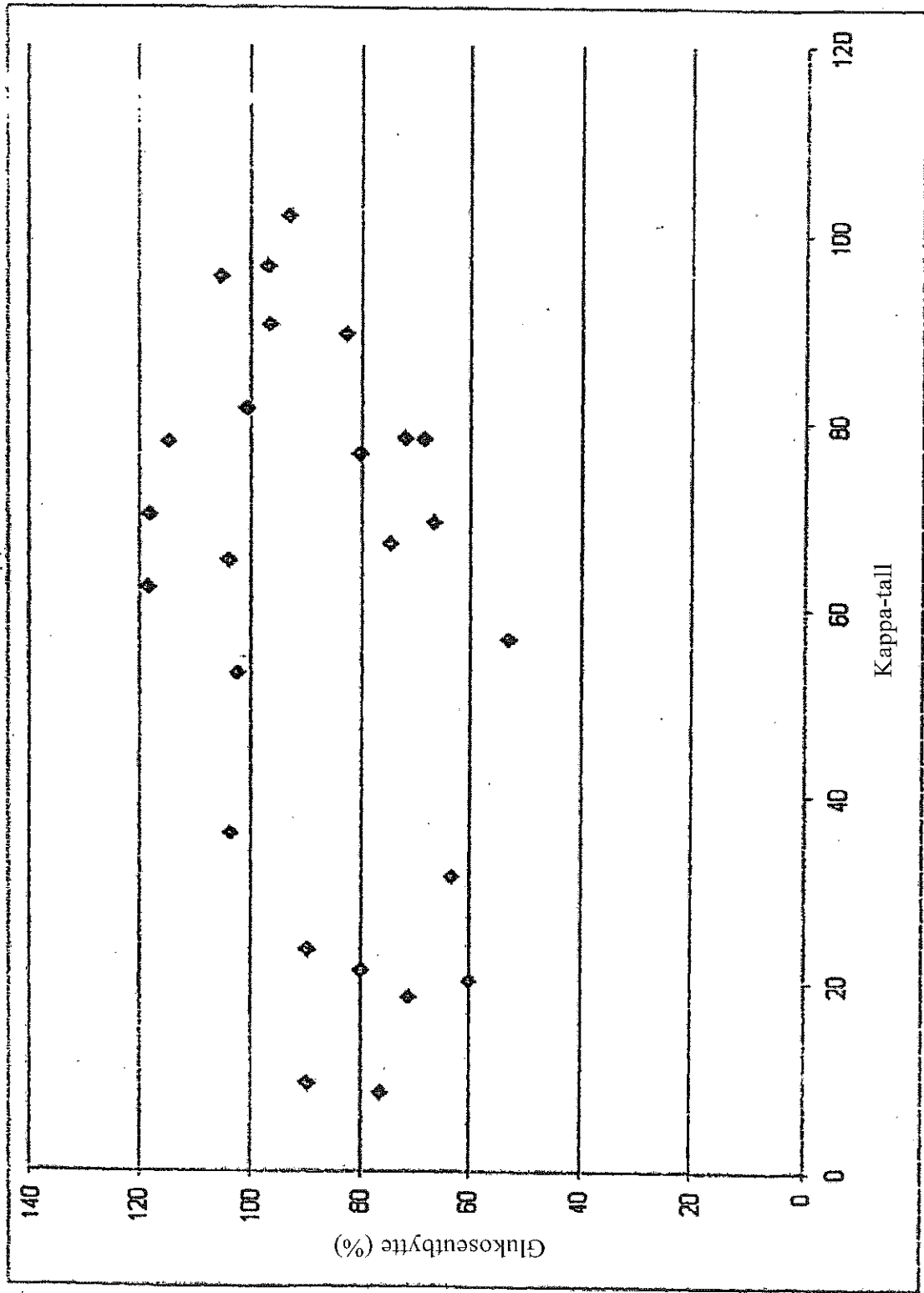


Fig. 3

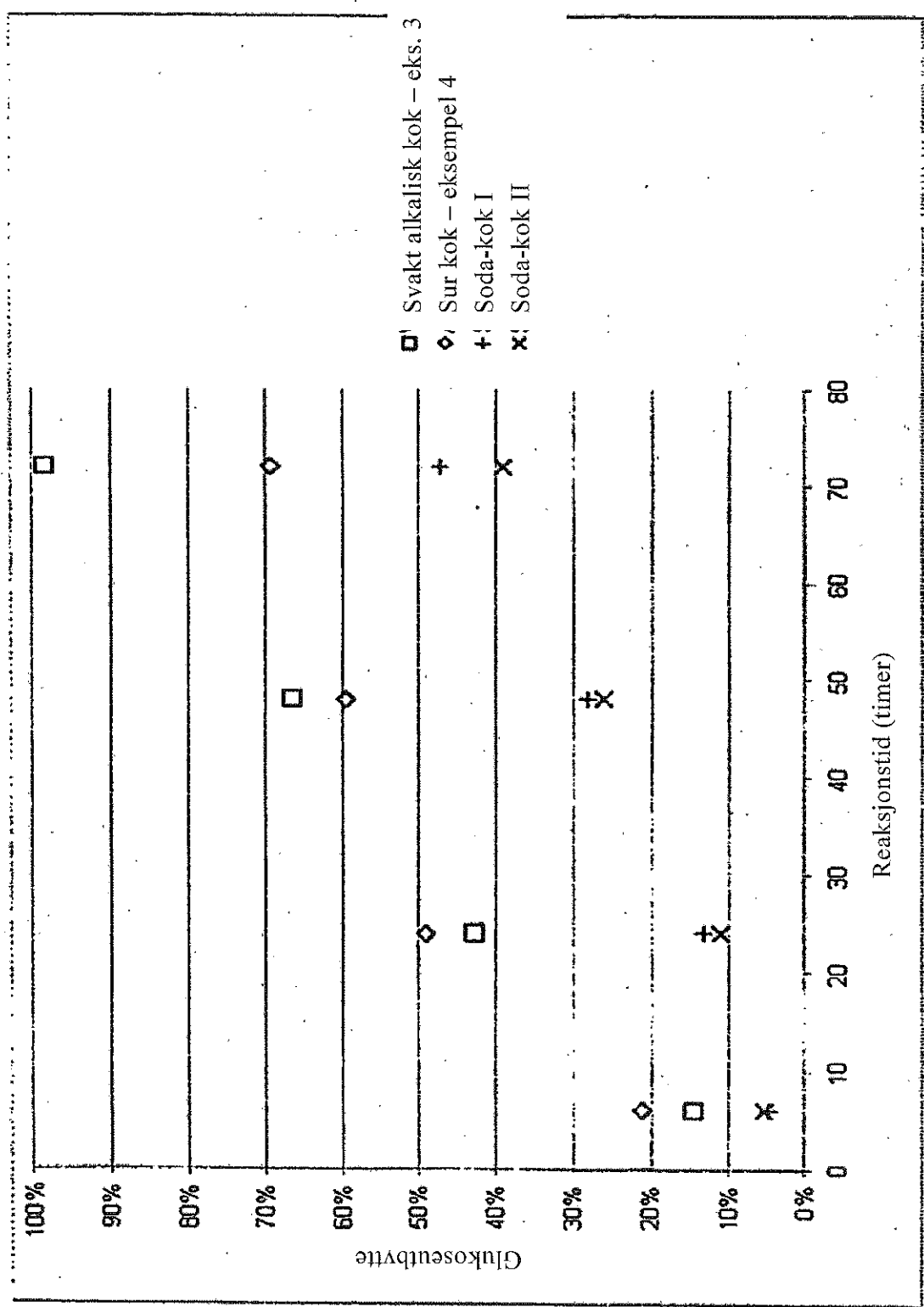


Fig. 4

Power of attorney

This form is a notification of an appointment or change of representative

*Most fields are mandatory. Fill out fields in the form marked * where applicable. Fill in the form using capital letters or type it. Please do not staple the pages together. See separate notes to the form.*



patent trademark design
Norwegian Industrial Property Office
Sandakervelen 64
Pb. 8160 dep 0033 Oslo
Telephone +47 22 38 73 00
Info center +47 22 38 73 33
mail@patentstyret.no
www.patentstyret.no
Bank account 8276 01 00192
Org.no. 971526157 MVA

Subject area Trademark Design Patent

One subject area per form only.

Application/ registration number

Appl. No./Reg. No./Patent No. 09774846.1	Trademark/design/title of patent Validation of EP2376642 in Norway
Appl. No./Reg. No./Patent No.	Trademark/design/title of patent

The power of attorney applies to the following application/registration: (Please use the list on the next page if the list below is not sufficient.)

Attachments * Check box if additional documentation is attached.

Change of representative This is a notification of change of representative.

Your reference regarding this notification:
P23615NOFP

Representative

I/we hereby authorize:

Given name/Company name: ONSAGERS AS		Surname:
Address:		
Postal code:	City:	Country:
Organisation number, if company:		Customer ID: 1075

the power to file an application and represent me/us in everything concerning it, and after the application has been registered, to receive announcements and other procedural communications relating to it. I/we hereby also confer upon the representative the right to withdraw the application, partially or totally, and to request a partial or total cancellation of the protection. This power of attorney includes divisional and separate applications and protection obtained on the basis of such applications. The representative is authorised to transfer this power of attorney to another agent.

Applicant/ holder

Given name/Company name: Borregaard AS		Surname:
Address: Hjalmar Wessels vei 10		
Postal code: N-1721	City: Sarpsborg	Country: Norway
Organisation number, if company:		Customer ID:

Signature

Place: Sarpsborg	Date: 07-Jan-2014	Signature (the holder or his/her representative): R A
----------------------------	-----------------------------	---

For Insertion of the representative's logo (optional)

onsagers